

CaPKR-like 在鲫鱼与草鱼组织中的表达特性分析

彭 悟, 汤雅男, 胡成钰*

(南昌大学 生命科学院, 江西 南昌 330031)

摘要: PKR 是由干扰素诱导的最重要的抗病毒蛋白之一, 能抑制细胞和病毒蛋白的合成。鲫鱼 PKR 基因(*CaPKR-like*)是鱼类第一个,也是非哺乳类脊椎动物第一个报道的 PKR 全长 cDNA 序列。本研究制备了 *CaPKR-like* N-端包含 $Z\alpha$ 结构域的多克隆抗体,采用 Western blots 检验 *PKR-like* 在鲫鱼和草鱼组织中的表达特性。Western blots 显示在未诱导的鲫鱼和草鱼中该基因表达水平非常低,但是经 Poly I:C 免疫一周后,在鲫鱼和草鱼等 8 种组织中有较强的 PKR-like 蛋白产生。结果暗示: *CaPKR-like* 与哺乳类 PKR 有相同的组织表达特性。

关键词: PKR; *CaPKR-like*; 表达; 鲫鱼; 草鱼

中图分类号: Q786; Q959.468

文献标识码: A

文章编号: 0254-5853-(2007)05-0465-05

Characterization of *CaPKR-like* Expression in Tissues from Crucian and Grass Carp

PENG Wu, TANG Ya-nan, HU Cheng-yu*

(College of Life science, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

Abstract: Double-stranded RNA activated protein kinase (PKR) is an important antiviral protein induced by interferon (IFN). PKR was discovered as the enzyme responsible for inhibition of protein synthesis. *CaPKR-like* is the first fish *PKR-like* gene isolated from crucian carp. In the present study, the expression of *CaPKR-like* in the tissues of crucian and grass carp were analyzed by Western blots. In both species, *CaPKR-like* had a very low level of constitutive expression in un-stimulated tissues, but was up-regulated in all tissues tested in animals stimulated with Poly I:C for seven days. The expression analysis revealed the same characterization of *CaPKR-like* as mammalian PKR genes.

Key words: PKR; *CaPKR-like*; Expression; Crucian carp; Grass carp

PKR 是双链 RNA(dsRNA)激活的、干扰素(IFN)诱导的真核细胞翻译起始因子 2α (eIF- 2α)激酶,因来源不同也被称为 DAI 激酶、dsI 激酶、P1 激酶、TIK 激酶、P65 激酶、P68 或 P69 激酶(Proud, 1995; Clemens & Elia, 1997)。现在普遍认为 PKR 是由干扰素诱导的最重要的抗病毒蛋白之一,它作用于 eIF- 2α 并抑制细胞和病毒蛋白的合成,参与构成细胞抗病毒的第一道防线(Gale & Katze, 1998; Saunders & Barber, 2003)。许多研究证实:与 eIF- 2α 激酶家族的其他成员不同,PKR 有广谱的组织表达活性(Gale & Katze, 1998; Saunders & Barber, 2003; Baltzis et al, 2002; Jagus et al, 1999; Katze, 1995)。而且,PKR 在正常细胞和组织中表达量很低,而在病

毒和 IFN 诱导下其表达量会大大增强(Meurs et al, 1990; Stark et al, 1998)。PKR 表达的上调可能是表明细胞处于抗病毒状态(Katze, 1995; Stark et al, 1998),因此,开展 PKR 激活和表达的研究有利于了解 PKR 抗病毒应答的规律。目前对 PKR 及其表达的研究报道都源于人和哺乳动物的报道。

鲫鱼 PKR 基因(*CaPKR-like*)是鱼类也是非哺乳类脊椎动物第一个报道的类 PKR 全长 cDNA 序列(Hu et al, 2004)。Rothenburg et al (2005)也在斑马鱼中发现了一个具有 $Z\alpha$ 结构的 *PKR-like* (*DrPKZ*)基因,并与 *CaPKR-like* 高度同源。在推导的结构上,*CaPKR-like* 蛋白 N-端调节区没有典型的 dsRNA Binding Motif (RBM)域,取代的是两个 Z-DNA 结

收稿日期: 2007-06-28; 接受日期: 2007-08-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30560116)

*通讯作者 (Corresponding author), E-mail: hucy2008@21cn.com

第一作者简介: 彭 悟(1980 -), 女, 湖南永州人, 硕士研究生, 从事分子免疫学研究。

合域($Z\alpha$)。最近, Zhu (2006)在牙鲈中报道了一个哺乳类 PKR 的直向同源基因(*PoPKR*), 与 *PKR-like* 相比, *PoPKR* 更具有哺乳类 PKR 的结构特征。*PoPKR* 的克隆进一步提示鱼类 *PKR-like*(*DrPKZ*)非常耐人寻味。而且对 CaPKR-like 的 $Z\alpha$ 结构域功能研究初步显示, $Z\alpha$ 与 RBM 有功能的相似性, 即体外表达的 $Z\alpha$ 蛋白($P_{Z\alpha}$)能够结合 Poly I:C(聚肌胞苷酸), 并在体外聚合形成二聚体(Hu et al, 2005)。本文试图通过 Western blots 技术检验 *CaPKR-like* 在鲫鱼、草鱼正常组织和经 Poly I:C 免疫诱导的组织中的表达特征。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验用鲫鱼和草鱼(30—50 g), 各 12 尾, 购自江西省水产科学研究所。用作免疫的家兔, 体重 2 kg 左右, 由南昌大学医学院实验动物中心提供。

1.2 主要仪器和试剂

1.2.1 主要仪器 高速冷冻离心机、小型台式离心机、定量移液器: EPPENDORF 公司; 脱色摇床: 江苏海门医用仪器厂; 恒压恒流电泳仪: 北京市六一仪器厂; 超净工作台: 苏州净化设备有限公司; 电子天平: 梅特勒-托利多仪器上海有限公司; 高温烘箱: 上海智诚分析仪器制造有限公司; 转膜仪: IDEA SCIENTIFIC COMPANY; 超声波破碎仪: COLE PAMER 公司。

1.2.2 主要试剂 Hepes、DTT、 β -巯基乙醇、丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、Tris、SDS、APS、 β -磷酸甘油、EGTA、 $MgCl_2$ 、HEPES、PMSF、抑肽酶(Aprotinin)、亮抑肽酶(Leupeptin)、胰凝乳蛋白酶(Chymotrypsin)、胃蛋白酶抑制剂(Pepstatin)、Tween-20、立春红 S: SIGMA 公司; 硝酸纤维素膜、显色液 NBT、BCIP、AP buffer: TIANGEN BIOTECH 公司; 脱脂奶粉; 羊抗兔 IgG-AP: 中杉金桥; Poly I:C(用生理盐水配制): AMERSHAM BIOSCIENCES 公司。

1.3 质粒和菌株

表达质粒 pET-32 α 、表达宿主菌 BL21(DE3): 中国科学院水生生物研究所桂建芳实验室赠送。

1.4 多克隆抗体的制备

1.4.1 $Z\alpha$ 表达多肽的纯化 Z cDNA 克隆、表达载体(pET-32)构建、IPTG 诱导大肠杆菌 DE3、表

达多肽(P_Z)的纯化参照 Hu et al (2005)所用方法。

1.4.2 多克隆抗体的制备 将 1 mL 纯化 $Z\alpha$ 表达多肽(约 500 μ g)在家兔四肢淋巴结部位以及背部皮下多点注射, 每点注射约 0.1 mL。第一次注射 2 周后加强免疫 2 次, 间隔为 2 周, 注射蛋白量约为 500 μ g/只。第二次加强免疫后 11 天自心脏抽取血液。兔血于 37 $^{\circ}$ C 放置 1 h 后再在 4 $^{\circ}$ C 放置过夜, 4000 g 4 离心 10 min, 吸取上层的多抗血清, 分装后于 -80 $^{\circ}$ C 保存。用于 Western blots 免疫印迹。

1.5 鲫鱼和草鱼组织蛋白样的提取

未经诱导的和经 Poly I:C 免疫诱导一周后的鲫鱼和草鱼分别取以下各组织 100 mg: 脑、脾、心、肝、肾、肌、肠和皮肤。所有材料均以冰浴的 1 mL 蛋白抽提液(100 mmol/L β -磷酸甘油, 20 mmol/L EGTA, 15 mmol/L $MgCl_2$, 50 mmol/L HEPES, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF, 10 μ g/mL aprotinin, 10 μ g/mL leupeptin, 10 μ g/mL pepstatin, 10 μ g/mL chymostatin)匀浆。匀浆液(12000 g, 4 $^{\circ}$ C)离心 15 min, 取上清, 分装后 -80 $^{\circ}$ C 保存, 用于 Western blots。

1.6 Western blots

蛋白分子量标准、组织蛋白样经 12% SDS-PAGE 胶(BioRad Mini-Protein 电泳系统)分离, PAGE 胶在转膜缓冲液(25 mmol/L Tris pH8.3, 192 mmol/L 甘氨酸, 20% 甲醇)平衡, 按照 Trans-Blot 电泳转移系统操作指南装配转膜 Sandwich, 安装电转移系统, 15V 转膜 2.5 h, 把蛋白转移到硝酸纤维素膜上; 丽春红染色 5 min, 用 TBS 溶液(25 mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 500 mmol/L NaCl)轻轻漂洗膜, 用铅笔标记蛋白分子量标准; TBS 溶液漂洗膜 3 次, 每次 10 min; 5% 脱脂奶粉(TBS 溶液配制)室温封闭 1 h; 用含有 1% 脱脂奶粉和 1/1000 兔抗血清的 TBST(含 0.1% Tween-20)室温结合 1 h, 使一抗结合; TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG 二抗(TTBS 1:2000 稀释)孵育结合 1 h; TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 在显色液(NBT:BCIP:显色缓冲液 = 1:1:20)中避光显色, 待所需条带出现以后, 用清水冲洗终止反应。

2 结 果

2.1 表达多肽 $P_{Z\alpha}$ 的纯化

在本实验中用于制备抗体的多肽($P_{Z\alpha}$)包含 CaPKR-like 蛋白的 $Z\alpha 1$ 、 $Z\alpha 2$ 以及 49 个连接氨基酸,

预计分子量为 31kD(图 1)。泳道 1 为组氨酸亲和柱纯化的 $P_{Z\alpha}$, 图 1 显示 $P_{Z\alpha}$ 较纯, 符合制备多抗及下一步 Western blots 检测的要求。

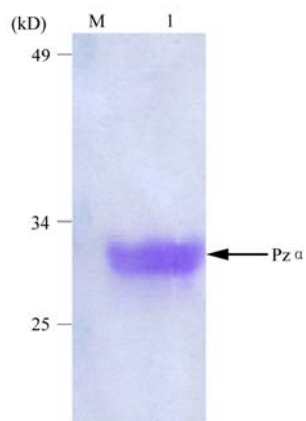


图 1 SDS-PAGE (12%)检测纯化的表达多肽 $P_{Z\alpha}$
Fig.1 Purification and expression of the polypeptide $Z\alpha$ by 12% SDS-PAGE

2.2 *CaPKR-like* 在鲫鱼、草鱼中的组织表达特性

从图 2 可以看出: 鲫鱼经 Poly I:C 诱导 7 d 后在脑、脾脏、心脏、肠道、肾、肌肉、肝脏、皮肤等被检组织中均能检测到 *CaPKR-like* 的表达产物(约 58 kD)。其中, 在心脏、肝脏、脾脏、肾、肌肉组织中该基因表达较强, 而在肠道和皮肤的表达略弱。在肌肉组织中除了目的条带外, 还在约 120 kD 处出现了 1 条特异的条带。在未诱导的鲫鱼各组织中未检测到 *CaPKR-like* 表达, 但在肌肉组织中也有 120 kD 带。

与 *CaPKR-like* 在鲫鱼各组织中的表达特征相似, 经 Poly I:C 诱导 7d 后, 在草鱼各组织中均检测到相应的表达产物(图 3)。其中, 脑、心脏、肌肉、肝脏、皮肤等组织中该基因表达较强, 而在脾脏、肠道、肾等组织中表达略弱。此外, 在脑、心脏、肌肉、肝脏目的条带的下方, 还出现了 1 条约 55 kD 的特异性条带。在鲫鱼肌肉组织中出现的 120 kD 条带也出现在草鱼肝脏组织中。在未诱导的组织中, 只在脑中有微弱的本底表达, 其他组织中表达不明显。

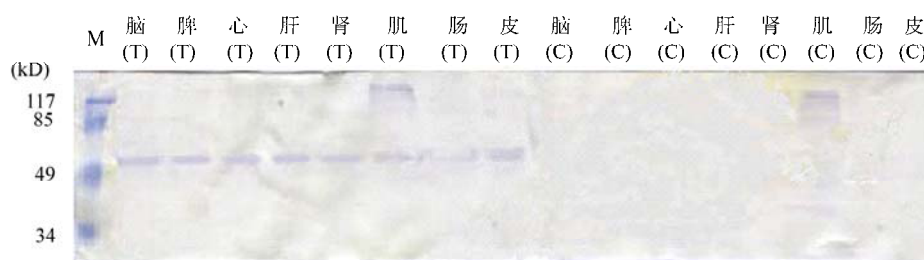
3 讨 论

哺乳类 PKR 基因有广谱的组织表达活性, 这是 PKR 区别 eIF2 α 激酶家族其他激酶基因的显著特

征之一(Gale & Katze, 1998)。在正常的组织和细胞中, PKR 有微弱的本底表达, 其表达的产物 PKR 通常以无活性的单体或二聚体的形式存在, 但与双链 RNA(dsRNA)结合后, PKR 的表达量有 5—7 倍的增强, 而且 PKR 形成有活性的二聚体或多聚体(Robertson & Mathews, 1996)。在本研究中, Western blots 证明了经 Poly I:C 免疫诱导后, 在所检的鲫鱼和草鱼组织中有 PKR-like 蛋白的产生(图 2, 图 3)。因此, *CaPKR-like* 与哺乳类 PKR 一样, 具有广泛的组织表达特性。

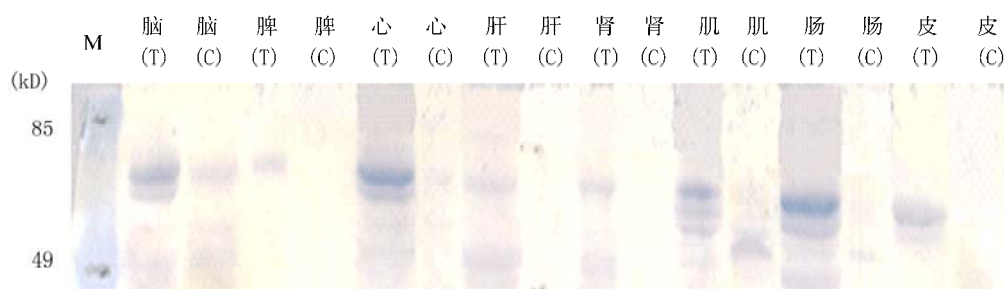
虽然草鱼“*PKR-like*”等干扰素系统基因和效应基因还未见报道, 但其干扰素基因的克隆和鉴定(Lin, 2006; Wang, 2005)初步表明: 草鱼可能具有与鲫鱼(Zhang et al, 2003)一样的干扰素体系。本实验的结果也可证明以上推测。虽然多抗($Z\alpha$)源于 *CaPKR-like*, 但在草鱼各组织中依然检测到了“*PKR-like*”。而且, *PKR-like* 的表达在草鱼、鲫鱼 8 种组织中有一定的相似性。有趣的是, 草鱼组织中该蛋白表观分子量约为 65kD(图 3), 而鲫鱼的约为 58 kD(图 2)。但这可能还不能说明潜在的草鱼“*PKR-like*”与 *CaPKR-like* 在分子量上有较大的差异, 毫无疑问这需要草鱼“*PKR-like*”基因的克隆来证实。而且, 有证据表明 Western blots 检测哺乳类 PKR 表达时, 存在分子量偏差的情况。人 PKR 编码 551 个氨基酸残基, 理论分子量约为 62 kD, 但在 Western blots 时实际检测到的蛋白分子量为 68 kD(Meurs et al, 1990)。小鼠 PKR 蛋白有 515 个氨基酸残基组成, 理论分子量约为 58kD, Western blots 检测时为 65kD(Tanaka & Samuel, 1991)。

本文中用于 Western blots 检测的多抗源于表达 *CaPKR-like* N-端 $Z\alpha$ 结构域的多肽($P_{Z\alpha}$)作为抗原免疫制备而来, 所以该多抗不可能识别鲫鱼细胞中丝氨酸/苏氨酸激酶超家族以及 eIF-2 α 激酶家族的其他成员。而 $Z\alpha$ 蛋白家族的其他成员如痘病毒 E3L 蛋白(25 kD)、鱼类 ADAR1(腺苷酸脱氨酶)蛋白(110—150 kD)的分子量与 *CaPKR-like*(58 kD)相差过大。因此, $Z\alpha$ 多抗能较为准确地检验鲫鱼和草鱼中 *PKR-like* 的表达。根据已报道的鱼类 ADAR1, 可以初步判断图 2、图 3 中出现的 120kD 特异性条带可能是鲫鱼和草鱼细胞中潜在的 ADAR1 蛋白。而在草鱼多种组织中出现的 55 kD 蛋白目前还不清楚, 推测可能与 *PKR-like* 的选择性剪切有关。因剪

图 2 *CaPKR-like* 在鲫鱼组织中的表达Fig. 2 *CaPKR-like* expression in crucian carp tissues by Western blots

T 为 Poly I:C 诱导; C 是未经诱导; M : 中分子量蛋白标准。

T: Crucian carp's tissue respectively induced by Poly I:C; C: Crucian carp's tissue respectively uninduced by Poly I:C; M: mid-range protein molecular weight marker.

图 3 *CaPKR-like* 在草鱼组织中的表达Fig.3 *CaPKR-like* expression in grass carp tissues by Western blots

T 为 Poly I:C 诱导; C 是未经诱导; M : 中分子量蛋白标准。

T showing crucian carp's tissue respectively induced by Poly I:C; C showing crucian carp's tissue respectively uninduced by Poly I:C; M: Mid-range protein molecular weight marker.

切方式的不同而产生多个不同转录本的现象在哺乳类 PKR 中也有报道。Icely et al (1991) 在小鼠细胞中发现 PKR 有 3 种转录本(2.5、4.0 和 6.0kb)。这 3 种转录本的分布有其组织特异性, 在精巢中, 2.5kb 占优势, 而在肺、心脏中, 4.0kb 比 2.5kb 和 6.0kb 要多得多。当然, 草鱼 55 kD 蛋白是否是 *PKR-like*

的其他形式仍需进一步的实验证实。

致谢: 本研究得到了中国科学院水生生物研究所桂建芳实验室的帮助; 在实验中得到了南昌大学生化与分子生物学重点实验室黄国俊教授的指导。在此一并感谢。

参考文献:

- Baltzis D, Li S, Koromilas AE. 2002. Functional characterization of *pkc* gene products expressed in cells from mice with a targeted deletion of the N terminus or C terminus domain of PKR [J]. *J Biol Chem*, **277**:38364-38372.
- Clemens MJ, Elia A. 1997. The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: Structure and function [J]. *J Interferon Cytokine Res*, **17**:503-524.
- Gale MJ Jr, Katze MG. 1998. Molecular mechanisms of interferon resistance mediated by viral-directed inhibition of PKR, interferon-induced protein kinase [J]. *Pharmacol Ther*, **78**:29-46.
- Hu CY, Zhang YB, Huang GP, Zhang QY, Gui JF. 2004. Molecular cloning and characterisation of a fish PKR-like gene from cultured CAB cells induced by UV-inactivated virus [J]. *Fish & Shellfish Immunol*, **17**:353-366.
- Hu CY, Xie ZB, Zhang YB, Deng ZD, Jiang J, Gui JF. 2005. Binding of the α domain from a *Carassius auratus* protein kinase PKR-like to Polyinosinic:Polycytidylic acid [J]. *Zool Res*, **26**:237-242. [胡成钰, 谢宗波, 张义兵, 陈玉栋, 邓政东, 蒋 珺, 桂建芳. 2005. 鲫鱼蛋白激酶 PKR-like 的 α 结构域与聚肌胞苷酸的结合. 动物学研究, **26**:237-242.]
- Icely PL, Gros P, Bergeron JJ, Devault A, Afar DE, Bell JC. 1991. TIK, a novel serine/threonine kinase, is recognized by antibodies directed against phosphotyrosine [J]. *J Biol Chem*, **266**:16073-16077.
- Jagus R, Joshi B, Barber GN. 1999. PKR, apoptosis and cancer [J]. *The*

- International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **31**:123-138.
- Katze MG. 1995. Regulation of the interferon-induced PKR: Can viruses cope? [J]. *Trends in Microbiology*, **3**:75-78.
- Lin HF. 2006. Molecular Cloning, Characterization, Tissue Distribution of Interferon and Nuclear Factor 45 Gene from Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and the Expression Analysis of Interferon in *Saccharomyces cerevisiae* [D]. Master thesis, Zhejiang University. [林慧芳. 2006. 鱼类干扰素和核因子 45 基因克隆、结构分析及其在酵母中表达的研究. 硕士学位论文, 浙江大学.]
- Meurs E, Chong K, Galabru J, Tomas NSB, Kerr IM, Williams BGR, Hovanessian AG. 1990. Molecular and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon [J]. *Cell*, **62**:379-390.
- Proud CG. 1995. PKR: a new name and new roles [J]. *Trends Biochem Sci*, **20**:241-246.
- Robertson HD, Mathews MB. 1996. The regulation of the protein kinase PKR by RNA [J]. *Biochimie*, **78**:909-914.
- Rothenburg S, Deigendesch N, Dittmar K, Koch-Nolte F, Haag F, Lowenhaupt K, Rich A. 2005. A PKR-like eukaryotic initiation factor 2 kinase from zebrafish contains Z-DNA binding domains instead of dsRNA binding domains [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **102**:1602-1607.
- Saunders LR, Barber GN. 2003. The dsRNA binding protein family: Critical roles, diverse cellular functions [J]. *FASEB J*, **17**: 961-983.
- Stark GR, Keer IM, Williams BGR, Silverman RH, Schreiber RD. 1998. How cells respond to interferon [J]. *Annu Rev Biochem*, **67**:227-264.
- Tanaka H, Samuel CE. 1994. Mechanism of interferon action: Structure of the mouse PKR gene encoding the interferon-inducible RNA-dependent protein kinase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**: 7995-7999.
- Wang L. 2005. Cloning and Expression of the α -interferon Gene from Grass Carp and Its Effects on Fish Pathogenic Rhabdovirus [D]. Master thesis, China Agricultural University. [王 莉. 2005. 克隆与表达草鱼干扰素基因及其抗弹状病毒效果的研究. 硕士学位论文, 中国农业大学.]
- Zhang YB, Zhang QY, Xu DQ, Hu CY, Gui JF. 2003. Identification of antiviral relevant genes in the cultured fish cells induced by UV-inactivated virus [J]. *Chinese Science Bulletin*, **48**:581-588. [张义兵, 张奇亚, 徐德全, 胡成钰, 桂建芳. 2003. 从灭活病毒诱导的培养细胞中鉴定鱼类抗病毒相关基因. 科学通报, **48**:457-463.]
- Zhu R. 2006. Molecular Cloning, Expressional Characterization and Functional Analysis of *Paralichthys olivaceus* eIF2 α Kinase Genes HRI and PKR [D]. Ph.D. thesis, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Science. [朱 蓉. 2006. 牙鲈 eIF2 α 激酶基因 HRI 和 PKR 的克隆、表达及功能分析. 博士学位论文. 中国科学院水生生物研究所.]

本刊编委肖衡教授简介

肖 衡, 男, 1958 年 3 月出生, 博士, 教授, 博士生导师, 教育部高等学校生物科学与工程教学指导委员会委员、生物科学专业教学指导分委员会副主任委员, 中国遗传学会动物遗传学委员会委员, 云南省动物学会副理事长, 云南省生物物种资源保护专家委员会副主任委员。1982 年 1 月毕业于云南大学动物学专业, 获理学学士学位, 留校任教至今。1986—1990 年在云南大学动物学专业读在职硕士, 获理学硕士学位; 1993 年 8—12 月在美国欧柏林学院 (Oberlin College) 学习细胞分子生物学和高等教育管理; 1996—2001 年在云南大学生态学专业攻读在职博士, 获理学博士学位。1994 年至今, 担任国家理科基础科学研究与教学人才培养基地云南大学生物学专业点负责人, 2002 年 7 月至今担任国家生命科学与技术人才培养基地云南大学生物技术专业点负责人。曾获教育部和国家自然科学基金委员会联合授予的“‘九·五’期间国家基础科学人才培养基金 (基地) 工作先进工作者”荣誉称号。主持和参加国家自然科学基金项目、国家重大基础科学研究计划项目、国家科技部国际合作重点项目计划专题、国家基础科学人才培养基金项目、国家生命科学与技术人才培养基地建设项目、教育部高等理工教育教学改革与实践项目、云南省科技攻关项目、云南省自然科学基金项目等 10 余项, 在 SCI 源刊、国内核心刊物等发表论文 21 篇, 获得云南省自然科学二等奖、三等奖各 1 项。先后担任过动物生物学、脊椎动物学、动物生态学、动物保护生物学等本科生、研究生课程 12 门。主持建成生态学与生物资源学“211 工程”重点学科实验室、云南大学生命科学实验教学中心, 发表教学研究论文 9 篇, 主编云南大学生命科学教学丛书 1 套 (3 部), 参编教材 1 部。获得校级教学成果奖 3 项、云南大学伍达观教育基金优秀教师奖优秀奖 1 项。